

# 好塩菌の塩ストレス適応機構とその応用

仲山 英樹\*

我々を取り巻く自然環境の中でも、地球の全表面の70%を占める海洋並びに乾燥地域に広がる塩類集積環境は、最も身近な極限環境の一つである。それゆえ、地球環境の生態系を支える極限環境生物として、塩類集積環境で活躍している好(耐)塩性の微生物群は、我々にとって最も重要な生物資源の一つであるといえよう。これまでに、古細菌、細菌、藻類、真菌類など、塩類集積環境に適応した多様な微生物群が分離・同定されている。

特に本稿では、塩濃度変化への適応範囲が広い広塩性の中度好塩菌の塩ストレス適応機構の研究により明らかとなってきた、「適合溶質」と称される機能性に優れた水溶性低分子有機化合物による動的な浸透圧ストレス適応機構に注目したい。

## 好塩菌の分類と塩に対する生理応答

一般的に好塩菌は、1978年にKushner<sup>1)</sup>により提案された最適増殖塩(NaCl)濃度による菌の分類法に従い、非好塩菌、低度好塩菌、中度好塩菌、高度好塩菌の4つのカテゴリーに分類される(表1)。

表1. 最適増殖塩濃度による菌の分類(文献1を改変)。

菌の分類	最適増殖塩(NaCl)濃度	菌の例
非好塩菌	0 - 0.2 M (0 - 1.2%)	大部分の土壌細菌
低度好塩菌	0.2 - 0.5 M (1.2 - 2.9%)	大部分の海洋細菌
中度好塩菌	0.5 - 2.5 M (2.9 - 15%)	含塩試料由来の細菌
高度好塩菌	2.5 - 5.2 M (15 - 30%)	大半が古細菌

これにより、塩ストレスにより増殖阻害が引き起こされる大腸菌(*Escherichia coli*)や大部分の土壌細菌などは、非好塩菌に分類される。塩分が要因となる極限環境としては、海水中の3%程度の塩濃度が地球上の大部分を占めるが、塩濃度が恒常的な海水中に適応した海洋細菌は、高塩濃度に適応できない低度好塩菌が大半を占めている。一方、恒常的な高塩濃度に適応した高度好塩菌として分類されるのは、*Halobacterium salinarum*や*Natronobacterium gregoryi*などの高い塩要求性を有する古細菌が大半を占めている。この分類法では、菌の特性である塩濃度の適応範囲が反映されていないため、同じ分類の好塩菌であっても、塩に対する生理的な応答が異なるという短所があった。例えば、*N. gregoryi*の最適増殖塩濃度は17.5%、*Bacillus saliphilus*

の最適NaCl濃度は16%であり、両者とも高度好塩菌に分類される。しかし増殖可能な塩濃度範囲は、*N. gregoryi*は12-30%、*B. saliphilus*は1-25%となっており、下限の塩の要求性にみられる差は1%と12%と極めて大きい。塩田や塩類集積土壌などの含塩試料由来の*Halomonas elongata*などの中度好塩菌は、比較的広範囲の塩分濃度に適応可能な広塩性を示すものが多い。

そこで、塩に対する生理的な応答による菌の分類法が、2010年に亀倉<sup>2)</sup>により提案された(表2)。

表2. 塩に対する生理的な応答による菌の分類(文献2を改変)。

菌の分類	塩に対する生理応答	菌の例
嫌塩菌	培地に塩を添加すると増殖が抑制される。	<i>E. coli</i>
耐塩菌	塩による抑制が弱く、10-20%の塩にも耐える。	<i>S. aureus</i>
好塩菌	塩を好む、塩の在の方が好きな菌。生理的食塩水程度の微量の塩で増殖するが、塩の添加により増殖が抑制される。	<i>V. parahaemolyticus</i>
高度好塩菌	高濃度の塩を好む菌。微量の塩でも増殖するが、10%程度以上の塩存在下で最適に増殖する。	<i>B. saliphilus</i> <i>H. elongata</i>
嗜塩菌	塩に依存する菌。微量の塩では増殖せず、少なくとも海水塩濃度(3-3.5%)以上の塩を要求する。	<i>K. indalini</i>
極度嗜塩菌	塩中毒、塩耽溺菌。嗜塩菌の中でも特に塩依存度が強く、増殖に10%程度以上の高濃度の塩の添加を要求する。それ以下の濃度では瞬時に死滅するものが多い。	<i>N. gregoryi</i>

これにより、塩により増殖阻害を受ける*E. coli*などは嫌塩菌に分類され、塩を含まない培地で増殖し、10-20%の塩に耐える黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)など

は耐塩菌に分類される。また、塩による増殖抑制制度に応じて、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)などは好塩菌に、*B. saliphilus* や *H. elongata* などは高度好塩菌に分類される。また、下限の塩の依存度に応じて、*Kushneria indalini* は嗜塩菌に、*N. gregoryi* は極度嗜塩菌に分類される。

以降の本稿の文章中では、好塩菌の分類は、Kushner の分類法(亀倉の分類法)として記述した。

### 細胞が受ける乾燥・塩ストレスによる障害

陸上環境中においては、乾燥により水分が蒸発した結果塩分が濃縮され、塩類集積環境が形成される。特に、かつて海底だった地層が隆起した陸地では、長い年月をかけて海水中の水分が蒸散して塩分が結晶化した岩塩が産出される高塩環境となっている。そのため、自然環境中においては、恒常的な海水環境よりも、陸上の方が乾燥に伴う水分の蒸散により極限的な塩類集積環境が形成されやすいといえる。興味深いことに、生物が細胞レベルで受ける塩ストレスによる障害も、乾燥ストレスと関連している。

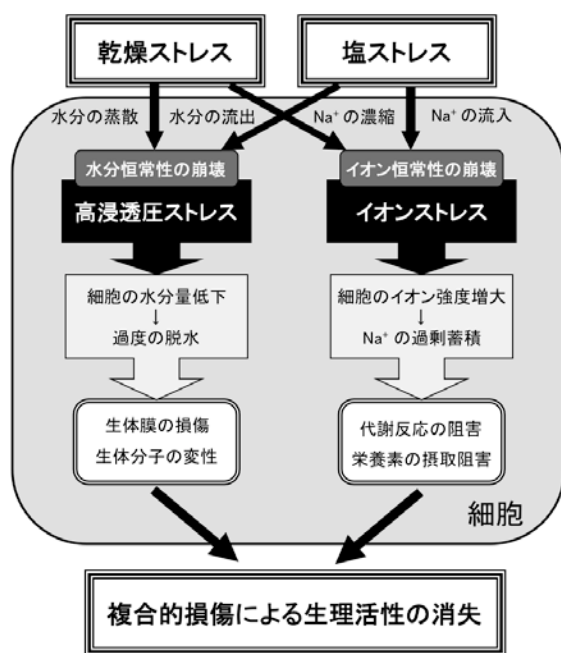


図1. 細胞が受ける乾燥・塩ストレスによる障害。

乾燥および高濃度の塩は、細胞内の水分を奪う高浸透圧ストレスを引き起こすが、過度の高浸透圧ストレスを受けた細胞は、脱水の閾値を超えた時点で不可逆的な細胞膜および細胞内タンパク質の変性などの致命的な損傷を受ける。加えて、乾燥により細胞の内外で濃縮された高濃度の塩分により引き起こされる塩ストレスにより、主要な毒性イオンである $\text{Na}^+$ イオンが細胞質ゾル中に高濃度蓄積することによって、代謝酵素の反応阻害や酵素タンパク質の変性が生じる。このイオン恒常性の崩壊はイオンストレスと

呼ばれており、高浸透圧ストレスと並んで塩ストレスの主要因子である。このように、乾燥・塩ストレスに曝された細胞は、浸透圧ストレスおよびイオンストレスの両ストレスにより、複合的な損傷を受ける（図1）。

### 細胞の塩ストレス適応機構

自然環境中では、動的な環境変化に絶えず曝されるが、生物は環境変化に適応して細胞内の恒常性を保つ機能を進化の過程で備えてきた。淡水、海水、濃縮海水中などにそれぞれ常在して生息している、非好塩菌（嫌塩菌）、低度好塩菌（好塩菌）、高度好塩菌（極度嗜塩菌）などは、生息環境中の塩分に差はあるが、塩分濃度が一定の恒常的な環境に適応しながら進化したため、塩分濃度の変化への適応範囲が狭い狭塩性を示すと考えられる。実際に、これらの狭塩性菌は、動的に塩分濃度が変化する環境に適応することができず、塩分濃度の閾値を超えると死滅してしまう。その一方で、塩田や塩類集積土壌など、塩分濃度が動的に変化する環境に生息する中度好塩菌（高度好塩菌）は、広範囲の塩分の濃度の変化に適応できる広塩性を備えている（図2）。好塩菌の備えた塩ストレス適応機構として、「適合溶質」と称される機能性に優れた水溶性の低分子有機化合物の生合成機構に関する研究が展開されてきた<sup>3)</sup>。

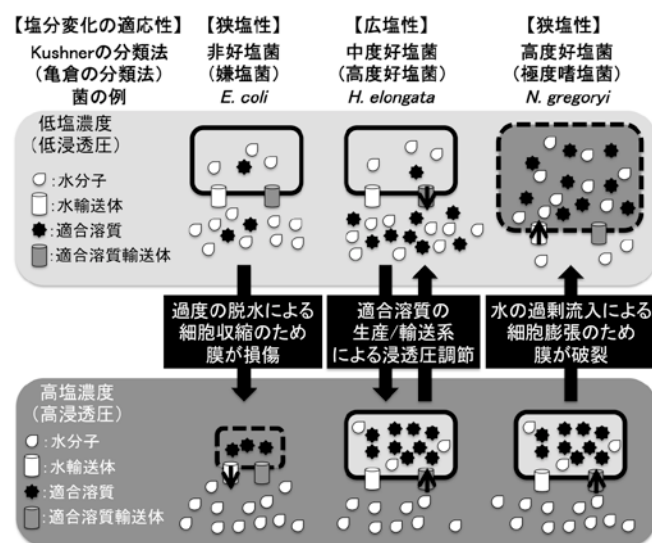


図2. 細胞の塩分変化に対する適応性の比較。

好塩菌が生合成できる適合溶質<sup>3)</sup>の種類は、菌株ごとに異なるため多岐にわたる（表3）。また、これまでの国内外の研究により、好塩菌の細胞内で生合成して蓄積される主要な適合溶質の量と種類は、環境中の塩濃度条件に応じて変化することが示されている。

例えば、高度好塩菌（極度嗜塩菌）の *Actinopolyspora halophila* では、15%塩濃度条件下でトレハロースとバタインが適合溶質として蓄積されるが、24%の高塩濃度条

下ではベタインの生合成のみが誘導され、トレハロースの蓄積量は減少すると共にベタインが主要な適合溶質として蓄積される<sup>4)</sup>。また、高度好塩菌（極度嗜塩菌）の *Natronococcus occultus* では、負電荷を帯びたトレハロース誘導体である 2-スルホトレハロースが適合溶質として生合成される<sup>5)</sup>。一方で、中度好塩菌（高度好塩菌）の *Chromohalobacter israelensis* では、0.6 M NaCl 以上の高塩濃度条件下でエクトインが主要な適合溶質として蓄積されるが、それより低い塩濃度環境下ではトレハロースが主要な適合溶質として蓄積される<sup>6)</sup>。また、中度好塩菌（高度好塩菌）の *H. elongata* では、低塩濃度条件下で L- $\alpha$ -グルタミン酸が適合溶質として蓄積されるが、環境中の塩濃度の上昇に応答してエクトインが主要な適合溶質として生合成されて蓄積し、さらに 10%以上の高塩濃度条件下ではエクトインに加えて、ヒドロキシエクトインの生合成が誘導される<sup>7)</sup>。そして、中度好塩菌（高度好塩菌）の *Nocardiopsis halophila* では、 $\beta$ -グルタミン酸やヒドロキシエクトインが適合溶質として蓄積する<sup>8)</sup>。

このように、好塩菌が塩ストレスに応答して生合成する適合溶質は多種多様であるが、適合溶質に共通する特性として、細胞内に高濃度蓄積しても生理活性を阻害しない浸透圧調節物質として機能できることに加え、生体膜および生体分子の構造および活性を維持する保護機能に優れている点が挙げられる。それにより、好塩菌は、高塩濃度条件下で十分量の適合溶質を細胞内に蓄積し、塩ストレスに適応できると考えられる。

表 3. 好塩菌が生合成する適合溶質の例（文献 3 を改変）。

化学形態	化合物名	生産菌の例
双性イオン	ベタイン	<i>A. halophila</i>
	エクトイン	<i>C. israelensis</i> , <i>H. elongata</i>
	ヒドロキシエクトイン	<i>H. elongata</i> , <i>N. halophila</i>
中性	トレハロース	<i>A. halophila</i> , <i>C. israelensis</i>
陰イオン	L- $\alpha$ -グルタミン酸	<i>H. elongata</i>
	$\beta$ -グルタミン酸	<i>N. halophila</i>
	2-スルホトレハロース	<i>N. occultus</i>

一方で、塩ストレスに応答して適合溶質を十分量生合成できない非好塩菌（嫌塩菌）は、高塩濃度環境中では過度の脱水により、細胞膜が損傷を受けて死滅する。その一方で、高度好塩菌（極度嗜塩菌）は、高塩濃度環境中で適合溶質を生合成して適応できるが、低塩濃度条件下では低浸透圧環境に適応できないため、過剰量の水の流入により細胞が破裂して死滅する。それらに対して、中度好塩菌（高度好塩菌）は、高塩濃度環境中で適合溶質を生合成して高

浸透圧環境に適応し、低塩濃度条件下では細胞内に蓄積した適合溶質を速やかに排出して低浸透圧環境に適応している（図 2）。そのため、効率的な適合溶質輸送系を備えた中度好塩菌（高度好塩菌）は、動的な塩ストレスにも適応できる広塩性を獲得したと考えられる。

適合溶質の工業生産への応用

近年、適合溶質がヒトの細胞に対しても有用な機能性を有することが明らかにされると共に、適合溶質の産業利用への展開が進んできた。特に、グリシンベタイン、エクトインなどに代表される保湿性等に優れた適合溶質を化粧品やトイレタリー製品に用いるファインケミカル産業への展開が進められている。

例えば *H. elongata* を用いたエクトインの工業生産においては、高塩濃度による高浸透圧条件下で適合溶質としてエクトインを細胞内に高濃度生産・蓄積させた後、低塩濃度による低浸透圧条件下で細胞内に蓄積したエクトインを細胞外に排出させて分離・回収する連続醗酵生産プロセスとなる、「細菌ミルク（Bacterial Milking）」プロセスが実用化されている<sup>9)</sup>。さらに最近では、*H. elongata* のゲノム情報を解読がすすめられ、ゲノム情報を活用した代謝工学によるエクトイン高生産株創製を目指した研究開発が本格的に始まっている<sup>10)</sup>。さらに、近年の化石燃料枯渇問題、二酸化炭素排出量増加による地球温暖化問題に対応するため、カーボンニュートラルな再生可能資源として、植物バイオマスを原料としたバイオリファイナリー技術の実現が期待されている。現在、日本国内においても、バイオマス由来の C5、C6 糖を炭素源として利用できる *H. elongata* を細胞工場として活用することにより、淡水化技術と融合した低環境負荷型のバイオリファイナリープロセスの構築（図 3）を目指した研究が開始されている<sup>11)</sup>。

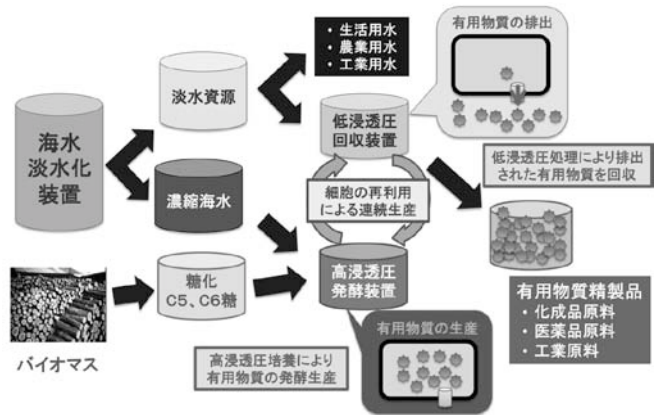


図 3. 好塩菌細胞工場による低環境負荷型バイオリファイナリー。

今後、好塩菌を活用した新規産業創出へ展開するために



は、適合溶質の高効率生産技術のみならず、好塩性の有用酵素生産技術<sup>12)</sup>、高塩濃度環境の浄化技術<sup>13)</sup>、および濃縮海水からの金属回収技術<sup>14)</sup>など、高塩濃度の極限環境に適応した好塩菌の特性を活かした技術革新を実現する研究開発の発展が期待される。

### 好塩菌の適合溶質生合成系を用いた植物分子育種

砂漠の緑化による地球環境の再生・修復、塩害地および海水の農業利用による食糧増産や植物バイオマスの増産に役立つ有用植物として、乾燥・塩ストレス耐性植物の育種に期待が寄せられている。これまで、我々人類は植物に有用形質を賦与するための品種改良を行ってきたが、その手法は膨大な時間と手間を必要とする近縁種間の交雑による育種が中心であった。それに対し、近年目覚ましい発展を遂げている分子生物学に裏打ちされた植物分子育種技術は、遺伝子組換え技術を利用して植物の染色体へ外来遺伝子を導入することによって、植物に有用形質を賦与できる画期的な手法である。さらに、近縁種以外の植物や微生物などがもつ有用形質を賦与するための遺伝子群(代謝系)を植物へ多重導入する植物代謝工学の発展によって、実用的な有用植物の分子育種が可能になると期待される。

細菌、酵母および植物において、細胞レベルでの乾燥・塩ストレス応答(図1)は、その根幹機構は共通であるため、植物以外の由来の遺伝子であっても、塩・乾燥ストレス耐性植物の育種への利用価値は高い。一方、植物由来であっても、復活草の脱水耐性機構や塩生植物でみられる塩腺などの特殊な機構は、分子生物学的知見が乏しい上に、恐らく複数の遺伝子が複雑に関与することから、その機構を他の植物へ機能的に賦与することは困難である。

これまでの国内外の研究成果により、耐塩性菌や好塩菌由来の適合溶質の生合成系遺伝子群(図4)を導入することにより、植物細胞の浸透圧ストレス耐性が向上することが報告されている。

例えば、耐塩性シアノバクテリア *Aphanothece halophytica* が備えたベタイン生合成経路(図4A)の2つの鍵酵素である、グリシンサルコシンメチル基転移酵素(GSMT)およびジメチルグリシンメチル基転移酵素(DMT)をコードした *ApGSMT* および *ApDMT* の両遺伝子<sup>15)</sup>を、モデル植物のシロイヌナズナに導入して発現させ、グリシンからのベタイン生合成能をシロイヌナズナに賦与することにより、シロイヌナズナ幼植物体の塩ストレス耐性が向上することが示された<sup>16)</sup>。また、中度好塩菌(高度好塩菌)の *H. elongata* が備えたエクトインの生合成経路(図4B)の3種の酵素をコードする3遺伝子(*ect* 遺伝子: *ectA*, *ectB*, *ectC*)<sup>17)</sup>をタバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum*, BY2)に導入して発現させると、細胞中にエクト

インの蓄積が確認された形質転換タバコ BY2 細胞の高浸透圧ショック耐性が顕著に向上することが示された<sup>18)</sup>(図5; ECT-1, ECT-24, ECT-80)。

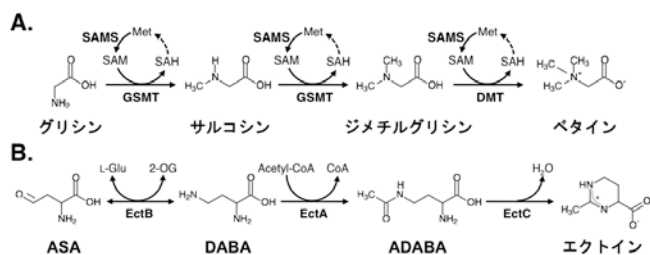


図4. ベタインおよびエクトインの生合成経路。

A, 耐塩性シアノバクテリア *A. halophytica* では、グリシンサルコシンメチル基転移酵素 (GSMT) および ジメチルグリシンメチル基転移酵素 (DMT) の2つの鍵酵素による、グリシンの3段階のメチル化反応によりベタインが生合成される<sup>15)</sup>。

B, 中度好塩菌(高度好塩菌) *H. elongata* では、リジンやトレオニン合成系の中間代謝物であるアスパラギン酸-β-セミアルデヒド(ASA) から、2,4-ジアミノ酪酸 (DABA)、Nγ-アセチル2,4-ジアミノ酪酸 (ADABA) を経る3段階の酵素反応によりエクトインが生合成される<sup>17)</sup>。

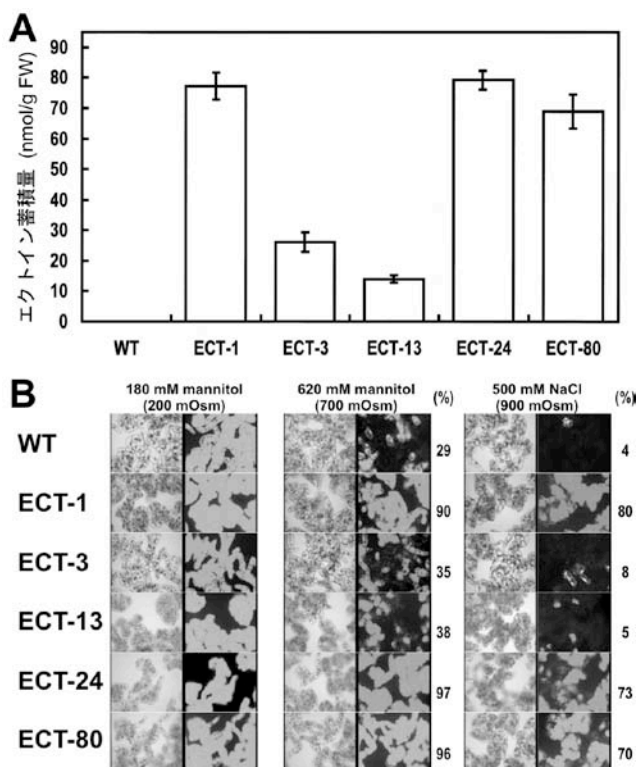


図5. エクトイン生産植物細胞の高浸透圧ショック耐性<sup>18)</sup>。

A, タバコ培養細胞の新鮮重量当たりのエクトイン蓄積量。

B, マンニトール等張液 (180 mM mannitol)、高濃度マンニトール溶液 (620 mM mannitol)、および高塩濃度溶液 (500 mM NaCl) を用いた 20 分間の浸透圧ショック処理後のタバコ細胞の生存率 (%)。

## おわりに

高塩濃度環境に適応した好塩菌の中でも、中度好塩菌（高度好塩菌）は、広塩性を有しており、動的な塩ストレスに適応することができる。なぜなら、高塩濃度条件下で適合溶質を生合成して十分量蓄積することにより、細胞内の浸透圧高くすることで、高浸透圧ストレスに適応しているからである。さらに、高塩濃度から低塩濃度条件に動的に変化した場合には、細胞内に蓄積された適合溶質を高効率に排出し、細胞内の浸透圧を低くすることで、低浸透圧ストレスに適応できるため、動的な塩ストレスの変化に柔軟に対応できる。しかしながら、好塩菌が備えた、優れた塩ストレス適応機構の詳細については、その大部分が明らかにされておらず、今後の基礎研究の進展が待たれる。

現在、適合溶質の工業生産や有用酵素生産など、好塩菌の産業利用を目指した応用研究も活発化しており、好塩菌の特性を活かした新規産業創出が期待される。

また、好塩菌の適合溶質生合成系遺伝子群を導入した植物の塩ストレス耐性が向上することが示されたことから、好塩菌などの有用遺伝子資源を利活用した耐塩性植物の分子育種技術の発展により、砂漠の緑化による地球環境の再生・修復、塩害地および海水の農業利用による食糧増産や植物バイオマスの増産などの夢が実現する日もそう遠くはないであろう。

## 文 献

- 1) Kushner, D. J.: *In Microbial life in extreme environments*, p.317, Academic Press (1978).
- 2) 亀倉正博: 極限環境生物学会誌, **9**, 57 (2011).
- 3) Roberts, M. F.: *Saline System*, **1**:5 (2005).
- 4) Nyssölä, A. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **176**, 294 (2001).
- 5) Desmarais, D. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **179**, 3146 (1997).
- 6) Regev, R. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 106 (1990).
- 7) Ono, H. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 362 (1998).
- 8) DasSarma, S. and Arora, P.: *In Encyclopedia of Life Sciences*, **8**, p. 458, Nature Publishing Group (2002).
- 9) Sauer, T. and Galinski, E. A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 306 (1998).
- 10) Schwibbert, K. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **13**, 1973 (2011).
- 11) 谷村幸亮ら: 第12回極限環境生物学会年会要旨集, p. 208 (2011).
- 12) 徳永廣子ら: 極限環境生物の産業展開, p. 107, シーエムシー出版 (2012).
- 13) 亀倉正博: 極限環境生物の産業展開, p. 114, シーエムシー出版 (2012).
- 14) 仲山英樹: 極限環境生物の産業展開, p. 97, シーエムシー出版 (2012).
- 15) Waditee, R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **278**, 4932 (2003).

16) Waditee, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1318 (2005).

17) Ono, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 91 (1999).

18) Nakayama, H. *et al.*: *Plant Physiol.*, **122**, 1239 (2000).